



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 969 017 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
05.01.2000 Patentblatt 2000/01

(51) Int. Cl.⁷: C07K 14/81, A61K 38/57

(21) Anmeldenummer: 99111763.1

(22) Anmeldetag: 18.06.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 30.06.1998 DE 19829014

(71) Anmelder: Centeon Pharma GmbH
35002 Marburg (DE)

(72) Erfinder:
• Gröner, Albrecht, Dr.
64342 Seehelm (DE)
• Römisch, Jürgen, Dr.
35041 Marburg (DE)

(54) Modifizierter C1-Esterase-Inhibitor zur Blockierung der Infektiosität von HIV

(57) Es wird ein modifizierter C1-Esterase-Inhibitor beschrieben, der einerseits an die Oberfläche von HIV, andererseits aber nicht an humane Zellmembranen bindet. Dieser modifizierte C1-Esterase-Inhibitor ist zur Blockierung der Infektiosität von HIV *in vivo* und *in vitro* verwendbar.

EP 0 969 017 A1

Beschreibung

[0001] Gegenstand der Erfindung ist ein modifizierter C1-Esterase-Inhibitor, der zur Blockierung der Infektiosität von Humanimmunodefizienzvirus (HIV) in vivo oder *in vitro* eingesetzt werden kann.

[0002] Es ist bekannt, daß die Entfernung von HIV aus biologischen Flüssigkeiten, vor allem aber aus Blut, Blutplasma oder Bluts serum eine wichtige Voraussetzung für ihren risikolosen Einsatz für die verschiedensten medizinischen Zwecke ist. Es sind deshalb auch schon zahlreiche Verfahren vorgeschlagen worden, mit denen eine Entfernung von HIV aus biologischen Flüssigkeiten erreicht werden soll. So ist in der internationalen Patentanmeldung WO 97/07674 ein Verfahren vorgeschlagen worden, mit dem HIV aus biologischen Flüssigkeiten entfernt oder inaktiviert werden können, in dem man sie mit bestimmten Ethylenimin-Oligomeren behandelt. Wichtig ist dabei, daß andere Bestandteile des Blutes, insbesondere die zellulären Bestandteile, vor allem die Erythrozyten, durch eine derartige Behandlung nicht beschädigt werden und die Entfernung von HIV in einfacher Weise und kurzer Zeit durchgeführt werden kann, damit genügend große Mengen gereinigten Blutes in einem wirtschaftlich vertretbaren Verfahren gewonnen werden können.

[0003] Es ist auch schon vorgeschlagen worden, HIV aus biologischen Flüssigkeiten mittels einer Filtration durch ein mit dem C1-Inhibitor imprägniertes Material adsorptiv zu entfernen.

[0004] Der C1-Inhibitor, auch als C1-Esterase-Inhibitor bezeichnet, ist ein im Blut vorhandenes Protein und ist der Hauptinhibitor des klassischen Weges des Komplementsystems und des Kontaktsystems. Der C1-Inhibitor kann die aktivierte Form des Faktors XII und des Kallikreins hemmen (Schapira M. et al., 1985, *Complement* 2: 111; Davis A.E., 1988, *Ann Rev Immunol* 6: 595; Sim R.B. et al., 1979, *FEBS Lett* 97: 111; De Agostini A. et al., 1984, *J Clin Invest* 73: 1542; Pixley R.A. et al., 1985, *J Biol Chem* 260: 1723; Schapira M. et al., 1982, *J Clin Invest* 69: 462; Van der Graaf F. et al., 1983, *J Clin Invest* 71: 149; Harpel P.C. et al., 1975, *J Clin Invest* 55: 593). Der C1-Inhibitor reguliert somit die Aktivitäten von zwei Plasmakaskaden, nämlich das Komplementsystem und das Kontakt system, durch die biologisch aktive Peptide erzeugt werden. Der C1-Inhibitor ist deshalb auch ein wichtiger Regulator des Entzündungssystems. Außerdem hemmt der C1-Inhibitor den aktivierten Faktor XI (Meijers J.C.M. et al., 1988, *Biochemistry* 27: 959; Wuillemin W.A. et al., 1995, *Blood* 85: 1517). Hieraus ergibt sich, daß der C1-Inhibitor als ein Coagulations-Hemmstoff betrachtet werden kann. Auch der Gewebeplasminogen-Aktivator und Plasmin werden in gewissem Ausmaß von dem C1-Inhibitor gehemmt, obwohl das nicht seine Hauptfunktion ist (Harpel P.C. et al., 1975, *J Clin Invest* 55: 149; Booth N.A. et al., 1987, *Blood* 69: 1600).

[0005] Der C1-Inhibitor wird in erheblichem Ausmaß

durch Reinigung aus Plasma gewonnen und für klinische Anwendungen benutzt, insbesondere bei der Behandlung des hereditären Angioödems, einer Erkrankung, die durch einen genetisch bedingten Mangel des C1-Inhibitors hervorgerufen wird. Außerdem ist bereits beschrieben worden, daß durch Verabreichung des C1-Inhibitors bei systemischen Entzündungen [Internationale Patentanmeldung WO 92/22320 (Genentech Inc.)], bei schweren Verbrennungen, Pancreatitis, Knochenmarktransplantationen, der Zytokin-Therapie und beim Einsatz in extrakorporalen Blutkreisläufen [DE-A-4 227 762 (Behringwerke AG)] gute therapeutische Erfolge erzielt wurden.

[0006] Die vollständige genomische und die cDNA, die für den C1-Inhibitor kodiert, ist bereits kloniert worden (Bock S.C. et al., 1986, *Biochemistry* 25: 4292; Carter P.E. et al., 1988, *Eur J Biochem* 173: 163). Verschiedene Varianten des rekombinanten C1-Inhibitors mit Aminosäuremutationen in der P1 und den P3 und/oder P5-Positionen des reaktiven Zentrums als auch Varianten, die aus Patienten mit einem hereditären Angioödem isoliert wurden, sind bereits rekombinant hergestellt worden (Eldering E. et al., 1988, *J Biol Chem* 263: 11776; Eldering E. et al., 1993, *J Biol Chem* 267: 7013; Eldering E. et al., 1993, *J Clin Invest* 91: 1035; US-Patent 5,622,930; Davis A.E. et al., 1992, *Nature Genetics* 1: 354; Eldering E. et al., 1995, *J Biol Chem* 270: 2579; Verpy et al., 1995, *J Clin Invest* 95: 350).

[0007] Der C1-Inhibitor gehört zu der großen Familie der Serin-Proteinase Inhibitoren, die auch Serpine genannt werden (Travis J. et al., 1983, *Ann Rev Biochem* 52: 655; Carrel R.W. et al., 1985, *Trends Bioch Sci* 10: 20). Auf SDS-Polyacrylamidgelen zeigt der C1-Inhibitor ein Molekulargewicht von etwa 105 kD. Seine Plasmakonzentration liegt bei etwa 270 mg/l (Schapira M. et al., 1985, *Complement* 2: 111; Nuijens J.H. et al., 1989, *J Clin Invest* 84: 443). Der C1-Inhibitor ist ein Protein, dessen Plasmaspiegel bei unkomplizierten Infektionen und anderen Entzündungen bis zum zweifachen ansteigen kann (Kalter E.S. et al., 1985, *J Infect Dis* 151: 1019). Die vermehrte Bildung des C1-Inhibitors bei Entzündungen dient wahrscheinlich dem Schutz des Organismus gegen die schädlichen Wirkungen der intravaskulären Aktivierung des Komplementsystems und des Kontakt systems während der akuten Reaktionen.

[0008] Die Serpine reagieren als Inhibitoren durch Bildung bimolekularer Komplexe mit der zu hemmenden Proteinase. Bei diesen Komplexen wird das aktive Zentrum der Proteinase durch das aktive Zentrum des Serpins gebunden und damit inaktiv (Travis J. et al., 1983, *Ann Rev Biochem* 52: 655). Die Serpine reagieren spezifisch mit bestimmten Proteinasen, wobei diese Spezifität durch die Aminosäuresequenz des reaktiven Zentrums bestimmt wird.

[0009] Die vorliegende Erfindung geht nun von der Beobachtung aus, daß die Infektiosität von HIV durch

die Verabreichung eines C1-Inhibitors blockiert werden kann.

[0010] Bekanntlich besteht der erste Schritt bei einer HIV-Infektion darin, daß Helfer-T-Lymphozyten (T_H -Zellen) des Immunsystems, die an ihrer Oberfläche CD4-Rezeptoren tragen, in eine Wechselwirkung mit den Oberflächenproteinen von HIV treten. Antikörper gegen CD4 blockieren *in vitro* die HIV-Infektion von T_H -Zellen. Auch bei einem Überschuß an freiem CD4-Protein geht die Infektionsrate *in vitro* zurück. Beide Behandlungen blockieren zwar die Infektion, zerstören jedoch nicht das Virus. In ähnlicher Weise läßt sich erfindungsgemäß durch Bindung von HIV an den C1-Inhibitor die direkte Wechselwirkung zwischen den Oberflächenproteinen von HIV und den CD4-Rezeptoren der T_H -Zellen unterbinden.

[0011] Der humane C1-Inhibitor weist jedoch nicht nur eine große Affinität zu den Hüllproteinen von HIV, sondern auch eine große Affinität zu den Oberflächenproteinen von Lymphozyten auf. Durch den C1-Inhibitor läßt sich nach Art eines Spacers eine brückenartige Verbindung zwischen dem HIV und der T_H -Zelle herstellen. Hierdurch läßt sich allerdings überraschenderweise die Infektiosität von HIV noch nicht vermindern. Das läßt sich jedoch erreichen, wenn ein modifizierter C1-Esterase-Inhibitor eingesetzt wird, der einerseits eine hohe Bindungsaffinität zu den Hüllproteinen von HIV aufweist, andererseits aber nicht an humane Zellmembranen bindet.

[0012] Modifizierte C1-Esterase-Inhibitoren stehen aus unterschiedlichen Quellen zur Verfügung. So zeigen die aus dem Blut von Rindern oder anderen Säugetieren gewonnenen C1-Esterase-Inhibitoren keine Affinität zu humanen Zellmembranen, insbesondere nicht zu den CD4-Rezeptoren der humanen T_H -Zellen. Ihre Affinität zu den Oberflächenproteinen von HIV (gp120 und gp41) kann jedoch mit der des humanen C1-Esterase-Inhibitors verglichen werden. Ein tierischer C1-Esterase-Inhibitor ist deshalb in der Lage, an die Oberflächenproteine von HIV zu binden, verhindert aber jeden Kontakt von HIV mit den humanen CD4-Rezeptoren, da der C1-Inhibitor an der Oberflächen der T_H -Zellen nicht haftet.

[0013] Es besteht jedoch auch die Möglichkeit auf gentechnologischem Weg modifizierte Varianten des humanen C1-Inhibitors herzustellen. Die genaue Aminosäuresequenz des humanen C1-Inhibitor und die DNA-Sequenz, die für diesen humanen C1-Inhibitor kodiert, sind von Bock et al., Biochemistry 25: 4292-4301, 1986 und von Davis et al., PNAS 83: 3161-3165, 1986 beschrieben. Biologisch wirksame Varianten des C1-Esterase-Inhibitors sind aus der Internationalen Patentanmeldung WO 91/06650 bekannt. Diese Varianten können durch rekombinante Expressionsverfahren hergestellt werden, wobei die für den C1-Esterase-Inhibitor kodierende DNA spezifische Deletionen, Einfügungen oder Substitutionen von Nukleotiden aufweist.

[0014] Grundsätzlich können zur Blockierung der

5 Infektiosität von HIV alle nicht-humanen C1-Esterase-Inhibitoren eingesetzt werden, die nicht an Lymphozyten binden. Dabei handelt es sich entweder um aus natürlichem Material isolierte, tierische C1-Esterase-Inhibitoren oder um rekombinant herstellte, tierische C1-Esterase-Inhibitoren. Außerdem kann ein rekombinant veränderter, humarer C1-Esterase-Inhibitor, dessen Bindungsfähigkeit an die CD4-Rezeptoren der T_H -Zellen aufgehoben ist, die Infektiosität von HIV blockieren. Hierfür sind Modifikationen der die Bindung an den CD4-Rezeptor bewirkenden Aminosäuresequenz des C1-Inhibitors erforderlich, die nach an sich bekannten rekombinanten Methoden durchgeführt werden können und insbesondere in der Internationalen Patentanmeldung WO 92/22320 beschrieben sind.

[0015] Die vorstehend genannten nicht-humanen C1-Esterase-Inhibitoren sowie rekombinant veränderte, humane C1-Esterase-Inhibitoren werden zweckmäßigerverweise parenteral und in einer für die therapeutische Wirkung ausreichenden Menge verabreicht. Sie werden im allgemeinen in einer physiologischen Kochsalzlösung, einer Ringerschen Lösung oder einem andern für Injektionszwecke geeigneten Trägermaterial dem Patienten zugeführt.

25

Patentansprüche

1. Modifizierter C1-Esterase-Inhibitor, dadurch gekennzeichnet, daß er einerseits an die Oberflächenproteine von HIV, andererseits aber nicht an humane Zellmembranen bindet.
2. C1-Esterase-Inhibitor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er tierischen Ursprungs ist.
3. C1-Esterase-Inhibitor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er rekombinanten Ursprungs ist.
4. Verfahren zur Blockierung der Infektiosität von HIV, dadurch gekennzeichnet, daß man sie mit einem modifizierten C1-Esterase-Inhibitor kontaktiert, der einerseits an HIV, andererseits aber nicht an humane Zellmembranen bindet.
5. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen C1-Esterase-Inhibitor nach den Ansprüchen 1 bis 3 in einer therapeutisch wirksamen Menge enthält.
6. Verwendung eines C1-Esterase-Inhibitor der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß er zur Blockierung der Infektiosität von HIV *in vivo* oder *in vitro* eingesetzt wird.

50

55



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 11 1763

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrieb Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	WO 95 06479 A (STICHLING CENTRAAL LABORATORIUM...) 9. März 1995 (1995-03-09) * Ansprüche 1,5-7,9-17 * ---	1-3,5,6	C07K14/81 A61K38/57
X,D	WO 91 06650 A (CETUS CORPORATION) 16. Mai 1991 (1991-05-16) * Ansprüche 1-17,22-24 * ---	1-3,5,6	
X,D	WO 92 22320 A (GENENTECH INC) 23. Dezember 1992 (1992-12-23) * Ansprüche 1-9 *	1-3,5,6	
X	FR 2 601 034 A (INSTITUT PASTEUR ET AL) 8. Januar 1988 (1988-01-08) * Ansprüche 1-5 *	1-3,5,6	
A	Z. PROHASZKA ET AL: "Interaction of complement and specific antibodies with the external glycoprotein 120 of hiv-1" IMMUNOLOGY, Bd. 85, Nr. 2, 1. Juni 1995 (1995-06-01), Seiten 184-189, XP002044878 * Zusammenfassung *	1-6	
A	H. SU ET AL: "Interaction of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus with C1q and fibronectin under conditions present in human saliva" MOLECULAR IMMUNOLOGY, Bd. 28, Nr. 8, 1991, Seiten 811-817, XP002117220 * Zusammenfassung *	1-6	C07K A61K
		-/-	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
BERLIN	1. Oktober 1999	Siatou, E	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 11 1763

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
A	<p>N. M. THIELENS ET AL: "Further characterization of the interaction between the C1q subcomponent of human C1 and the transmembrane envelope glycoprotein gp41 of HIV-1" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 151, Nr. 11, 1. Dezember 1993 (1993-12-01), Seiten 6583-6592, XP002117221 * Zusammenfassung *</p> <p>-----</p>	1-6	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p>			
Recherchenort BERLIN	Abschlußdatum der Recherche 1. Oktober 1999	Prüfer Siatou, E	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument Z : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 11 1763

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

01-10-1999

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9506479 A	09-03-1995	AU 678064 B AU 7823994 A CA 2170739 A EP 0716611 A JP 9501946 T	15-05-1997 22-03-1995 09-03-1995 19-06-1996 25-02-1997
WO 9106650 A	16-05-1991	AU 658560 B AU 6611290 A CA 2071871 A EP 0497833 A JP 5503001 T US 5622930 A	27-04-1995 31-05-1991 28-04-1991 12-08-1992 27-05-1993 22-04-1997
WO 9222320 A	23-12-1992	KEINE	
FR 2601034 A	08-01-1988	KEINE	

EFU/UFU/EM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82